

金メッキ体の表面処理法及び表面処理物、金メッキ体の製造方法及び金メッキ体、並びに含硫黄分子の固定化法

## BACKGROUND OF THE INVENTION

### 1. Field of the Invention

本発明は、多量の含硫黄分子の固定化を可能にする、金メッキ体の表面処理法及び表面処理物、金メッキ体の製造方法及び金メッキ体、並びに固定化法に関する。

### 2. Description of Prior Art

従来から、例えば、遺伝子検出におけるプローブ（目的遺伝子の探索子）の固定化や、レジスト（感光剤）等としての自己組織化膜（SAM）の固定化等、種々の分野において、金（Au）の表面に、S-H基、S-S基等を有する含硫黄分子を固定化する技術が知られている（S-H基と金の結合については、J.Am.Chem.Soc 111号P321～1989年 C. D. Bain 著や、Anal. Chem. 70号P2396～1998年 JJ.Gooding 著等参照）。

このような含硫黄分子の固定担体となる金としては、合金等の基材の表面に、通常公知のメッキ法により金をメッキ処理した金メッキ体等が使用されている。

しかし、このような金メッキ体では、その表面に少量の含硫黄分子しか固定化されないという問題があった。これは、金メッキ体表面の金結晶構造の配向が一定していないため、含硫黄分子が有するS-H基やS-S基等と金との結合（配位結合）反応量が低下することに起因すると考えられている。

そこで、金メッキ体の表面構造の配向を一定化させ、多量の含硫黄分子を金メッキ体に固定化させるべく、金メッキ体を形成する過程における金メッキ処理の温度等の条件を適宜変更することが考えられるが、このような条件を変更することは實際上困難であった。

10067502.020702

## SUMMARY OF THE INVENTION

従って、本発明の目的は、多量の含硫黄分子の固定化を可能にする、金メッキ体、金メッキ体の表面処理法及び表面処理物並びに固定化法を提供することにある。

本発明者らは、鋭意研究した結果、金メッキ処理後の金メッキ体の表面に、特定温度の範囲内でアニール化処理を施す方法が、前記目的を達成し得ることの知見を得た。

本発明は、前記知見に基づきなされたもので、多数の含硫黄分子が固定化可能なように、金メッキ体の表面に、温度 350～790℃でアニール化処理を施す、金メッキ体の表面処理法を提供するものである。

また、本発明は、前記表面処理法により処理された金メッキ体の表面処理物を提供するものである。

また、本発明は、前記表面処理法により処理した金メッキ体の表面処理物に、多数の含硫黄分子を固定化する、含硫黄分子の固定化法を提供するものである。

更に、本発明者らは、特定の添加剤を添加した原料により製造される金メッキ体が、前記目的を達成し得ることの知見も得た。

本発明は、この知見に基づきなされたもので、表面に多数の含硫黄分子が固定化可能な金メッキ体を製造する方法であって、結晶成長剤を含む原料から表面金結晶を形成する金メッキ体の製造方法を提供するものである。

また、本発明は、前記製造方法により得られる金メッキ体を提供するものである。

また、本発明は、前記製造方法により得られた金メッキ体に、多数の含硫黄分子を固定化する、含硫黄分子の固定化法を提供するものである。

## DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

### 〔金メッキ体の表面処理法〕

以下、本発明の金メッキ体の表面処理法を、その好ましい実施形態に基づいて詳細に説明する。

本発明の表面処理法は、多数の含硫黄分子が固定化可能なように（好ましくは、S-H基又はS-S基を有する多数の含硫黄分子が該S-H基又はS-S基を介して固定化可能なように）、金メッキ体の表面に、温度350～790℃でアニール化処理を施す方法である。かかる範囲内の温度でアニール化処理することにより、前記含硫黄分子が多数固定化できる表面処理物が得られる。

本発明において、アニール化処理は、JIS K 6900に準拠して行う。

アニール化処理の温度は、前述の通り350～790℃であるが、ここでの温度は、ピーク温度（最高値）をいう。具体的には、アニール化処理を、室温（通常10～30℃）の初期温度から昇温速度5～30℃/min. で昇温しながら行い、ピーク温度である前記温度となったときに昇温を止め、その後定温状態で行う。

アニール化処理の温度が350℃未満では、前記含硫黄分子の金メッキ体表面への固定化量が不十分となる。一方、アニール化処理の温度が790℃を超えると、例えば、基材をAgろう（共晶Ag-Cu）で支持体に立着して使用する場合にそのAgろうが再溶解して基材が倒れる現象が起こる等、金メッキ体を構成する基材やその基材の周辺部材が溶解する等の問題が生じる。

特に、前記含硫黄分子の固定化量の増量、及び基材とその周辺部材への悪影響防止の点から、アニール化処理の温度は、450～700℃が好ましい。

アニール化処理の処理時間は、前記範囲内の処理温度に応じて適宜調整されるが、一般には、30～600分の範囲内で処理を行う。

特に、350～600℃の処理は、30～240分間行うのが好ましい。

また、600～790℃の処理は、60～240分間行うのが好ましい。

また、アニール化処理は、通常、還元ガス（水素と窒素の混合ガス）の存在下で行うが、特に制限されず、水素100%下、窒素100%下、又は真空下で行ってもよい。

特に、アニール化処理は、得られる表面処理物の表面金結晶が（1，1，1）面の配向面を30%以上、特に60%以上有する構造になるように処理することが好ましい。この（1，1，1）面は金原子の最密パッキング構造であり、特定含有量以上の（1，1，1）面を有する結晶構造を表面に有することで、配向が一

定となり、含硫黄分子が有するS-H基やS-S基等との結合部位も一定数確保されると考えられる。

尚、(1, 1, 1)面の含有率の測定法は、後述の実施例で示す通りである。

本発明の表面処理法において、アニール化処理の対象である金メッキ体としては、特に制限されず、種々の基材の表面を種々の公知のメッキ法〔例えば、電気メッキ法、化学（無電解）メッキ法等〕によってメッキしたものが使用される。

本発明においては、金メッキ体として、特に、コバルト、ニッケル、鉄等を含む合金等かなる導電性基材を必要に応じ下地処理した後に金メッキ溶液に浸漬し、該導電性基材及び該金メッキ溶液に電流を流して得られた電気メッキ体を使用することが好ましい。とりわけ、特定の配列を有するDNA、RNA等の遺伝子の電気化学的検出方法に適用する検出チップの電極としてのピン等の用途に使用される電気メッキ体が好ましい。この検出チップのピンの場合には、遺伝子にS-H基やS-S基等を導入して固定化する面、即ちピンの先端をアニール化処理する。

電気メッキ体を使用する場合、該電気メッキ体を形成する過程において、導電性基材を浸漬する金メッキ溶液に、結晶成長剤を好ましくは0.5～5ppm（重量基準）添加することが望ましい。かかる結晶成長剤を添加した金メッキ溶液を用いて形成した電気メッキ体を、本発明の表面処理法に適用することで、得られる表面処理物の表面金結晶における(1, 1, 1)面の含有率が向上し、前記含硫黄分子の固定化率がより多くなるため好ましい。

ここで、結晶成長剤としては、例えば、硫酸タリウム、塩化タリウム、硝酸タリウム等のタリウム(Tl)系結晶成長剤や、塩化鉛、クエン酸鉛等の鉛(Pb)系結晶成長剤等が挙げられる。特に、前記(1, 1, 1)面の含有率、前記含硫黄分子の固定化率に優れる点で、タリウム系結晶成長剤が好ましい。

本発明の表面処理法により得られる金メッキ体の表面処理物に固定化させる含硫黄分子としては、S-H基やS-S基を有する含硫黄分子の他、金表面に固定し得る全ての含硫黄分子が挙げられる。

本発明においては、前記含硫黄分子として、特に、核酸残基、蛋白質残基又は蛋白質結合性基を含むものが好ましい。

核酸残基を含む含硫黄分子としては、DNA、RNA等の核酸にS-H基やS-S基等を導入したもの等が挙げられる。

また、蛋白質残基を含む含硫黄分子としては、蛋白質にS-H基やS-S基等を導入したものや、S原子を分子内に有する蛋白質そのもの等が挙げられる。

また、蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物は、S-H基やS-S基等を有する化合物に、リンカー等によりカルボキシル基やアミド基等の蛋白質結合性基をもたせたもので、金メッキ体表面にSAM（自己組織化単分子膜）を形成して固定化し得るもの等が挙げられる。蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物の具体例としては、4, 4'-ジチオジブチル酸〔4, 4'-Dithio Dibutyric Acid (DDA)〕等が挙げられる。このような蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物を固定化させた後、該蛋白質結合性基に、蛋白質を結合させることにより、プロテインチップ等として利用することが可能となる。例えば、蛋白質結合性基を含む含硫黄化合物としてDDAを使用する場合には、分子内に有するS-S基を介してDDAを金メッキ体表面にSAMの単分子膜を形成させて固定化した後、固定化されたDDA末端の蛋白質結合性基としてのカルボキシル基をEDA（水溶性カルボジイミド）やNHS（N-ヒドロキシコハク酸イミド）等で活性化させ、これに蛋白質を結合させる。

また、本発明においては、前記含硫黄分子として、塩基配列が未確認の遺伝子（目的遺伝子）を検出するためのプローブ（好ましくはS-H基又はS-S基を導入したもの）であることも好ましい。ここで、プローブとは、目的遺伝子を探索する探索子の意味である。プローブとしては、目的遺伝子と相補的な塩基対部分を有する遺伝子が用いられ、具体的には、同一の又は異なる遺伝子配列を有する複数のPCR産物、オリゴヌクレオチド、mRNA、cDNA、PNA（peptidic nucleic acid）、又はLNA（locked nucleic acid ; Proligo LLC 社商標）等が用いられる。

本発明の表面処理法においては、このようなプローブもS-H基やS-S基等を介して金メッキ体の表面に多数固定化させるように処理するため、得られる表面処理物への固定化プローブが増加し、延いては検出可能となる塩基配列が未確認の遺伝子の数を増加させることができる。

#### 〔金メッキ体の表面処理物〕

本発明によれば、前述した表面処理法により処理された金メッキ体の表面処理物を提供することができる。かかる金メッキ体の表面処理物は、前述した多数の含硫黄分子（好ましくはS-H基又はS-S基を有する多数の含硫黄分子）を固定化することができる。

本発明の表面処理物は、その表面金結晶が（1， 1， 1）面の配向面を通常、30%以上有する構造のものである。このような構造を表面に有する本発明の表面処理物は、より多くの前記含硫黄分子を固定化することができる。

#### 〔含硫黄分子の固定化法〕

また、本発明によれば、前述した表面処理法により処理した金メッキ体の表面処理物に、多数の含硫黄分子（好ましくはS-H基又はS-S基を有する多数の含硫黄分子）を固定化する方法（含硫黄分子の固定化法）を提供することができる。かかる固定化法によれば、従来可能でなかった量の前記硫黄分子の金メッキ体への固定化を可能とする。尚、固定化量の測定法は、後述の実施例で示す通りである。

#### 〔金メッキ体の製造方法〕

本発明によれば、表面に多数の含硫黄分子が固定化可能な金メッキ体を製造する方法であって、結晶成長剤を含む原料から表面金結晶を形成する金メッキ体の製造方法が提供される。このような方法によると、含硫黄分子が多数固定化できる金メッキ体を得られる。

特に、本発明の製造方法においては、金メッキ溶液に結晶成長剤を添加し、そこへ導電性基材を浸漬し、該導電性基材及び結晶成長剤を添加した該金メッキ溶液に電流を流して金メッキ体を得ることが好ましい。例えば、コバルト、ニッケル、鉄等を含む合金等かならる導電性基材を使用し、この導電性基材を必要に応じ下地処理した後に、結晶成長剤を添加した金メッキ溶液に浸漬し、該導電性基材及び結晶成長剤該金メッキ溶液に電流を流すことにより金メッキ体を得る。とりわけ、特定の配列を有するDNA、RNA等の遺伝子の電気化学的検出方法に適用する検出チップの電極としてのピン等の用途に使用できる金メッキ体を形成することが好ましい。

また、表面金結晶が（１，１，１）面の配向面を３０％以上、特に６０％以上有する構造になるように、金メッキ体を形成することが好ましい。特に、検出チップのピンを形成する場合には、遺伝子にＳ－Ｈ基やＳ－Ｓ基等を導入して固定化する面、即ちピンの先端が少なくともこのような構造になるように形成することが好ましい。

本発明の製造方法においては、金メッキ溶液等の原料中に、結晶成長剤を好ましくは０．５～５ｐｐｍ（重量基準）含有させることが望ましい。この含有量の範囲内であると、得られる金メッキ体の表面金結晶における（１，１，１）面含有率が向上し、含硫黄分子の固定化率がより多くなるため好ましい。

ここで、結晶成長剤としては、例えば、硫酸タリウム、塩化タリウム、硝酸タリウム等のタリウム（Ｔ１）系結晶成長剤や、塩化鉛、クエン酸鉛等の鉛（Ｐｂ）系結晶成長剤等が挙げられる。特に、前記（１，１，１）面の含有率、前記含硫黄分子の固定化率に優れる点で、タリウム系結晶成長剤が好ましい。

本発明の製造方法により得られる金メッキ体の表面に固定化させる含硫黄分子としては、前述した表面処理法により得られる表面処理物に固定化させる含硫黄分子と同様のものが挙げられる。従って、本発明の製造方法においても、前記含硫黄分子は、核酸残基、蛋白質残基又は蛋白質結合性基を含むこと又は塩基配列が未確認の遺伝子を検出するためのプローブであることが好ましい。このようなプローブもＳ－Ｈ基やＳ－Ｓ基等を介して金メッキ体の表面に多数固定化させるように処理するため、得られる金メッキ体への固定化プローブが増加し、延いては検出可能となる塩基配列が未確認の遺伝子の数を増加させることができる。

#### 〔金メッキ体〕

本発明によれば、前述した製造方法により得られた金メッキ体を提供することができる。かかる金メッキ体は、前述した多数の含硫黄分子（好ましくはＳ－Ｈ基又はＳ－Ｓ基を有する多数の含硫黄分子）を固定化することができる。

本発明の金メッキ体は、その表面金結晶が（１，１，１）面の配向面を通常、３０％以上有する構造のものである。このような構造を表面に有する本発明の金メッキ体は、より多くの前記含硫黄分子を固定化することができる。

#### 〔含硫黄分子の固定化法〕

また、本発明によれば、前述した製造方法により得られた金メッキ体の表面に、多数の含硫黄分子(好ましくはS-H基又はS-S基を有する多数の含硫黄分子)を固定化する方法(含硫黄分子の固定化法)を提供することができる。かかる固定化法によれば、従来可能でなかった量の前記硫黄分子の金メッキ体への固定化を可能とする。

### 【実施例】

以下、実施例及び比較例を挙げて、本発明を更に詳細に説明する。しかしながら、本発明はこれらの実施例に何等限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕

##### (金メッキ体の作製)

Co-Ni-Fe合金からなる複数の導電性材料の周囲をNiで下地処理した、Ni層を有する複数の導電性基材(遺伝子検出チップ用ピン)を用い、これをシアン系金メッキ液に浸漬し、基材と金メッキ液にメッキ電流密度 $0.25\text{ A/dm}^2$ の電流を通じて、厚さ $2.0\sim 3.0\text{ }\mu\text{m}$ の金表面層を有する金メッキ体を得た。

##### (アニール化処理)

得られた金メッキ体の表面に、還元ガス( $\text{H}_2:\text{N}_2=15:85$ )雰囲気下にて、温度 $450^\circ\text{C}$ でアニール化処理を施した。具体的には、アニール化処理を、室温( $25^\circ\text{C}$ )の初期温度から昇温速度 $19^\circ\text{C/min}$ で昇温しながら行い、ピーク温度 $450^\circ\text{C}$ となったときに昇温を止め、その後定温状態で行った。この際、 $400^\circ\text{C}$ 以上の処理を約20分間行った。

##### ((1, 1, 1)面の含有率)

金メッキ体の表面の金結晶構造における配向面のうち、(1, 1, 1)面の含有率(%)をX線回折測定により次のようにして算出した。その結果を下記結果欄に示す。

X線回折測定は、リガク製RINT1400V型により通常測定( $2\theta=10\sim 100^\circ$ 、 $\text{CuK}\alpha$ )で行った。金結晶構造の配向性は、金のX線回折パターンのピーク強度比により定性的に確認することができる。標準となる金粉末(配向なし)のピーク強度比と金メッキのピーク強度比とを比較し、あるピーク強度



比が大きくなっていけば、その面に配向していると考えられる。一般に、(1, 1, 1)、(2, 2, 2)、(1, 0, 0)、(2, 0, 0)等の面のピークは、他の面と比べて配向し易い傾向がある。このため、本実施例では、あまり配向の影響を受けにくいと考えられる(3, 1, 1)のピーク強度を基準となるピークとし、その他のピーク強度比を算出した。そして、それぞれのピーク強度比から、各配向面の含有率(%)を算出した。尚、下記には、(1, 1, 1)面の含有率(%)のみ示す。

#### (固定化法)

固定化に際しては、予め前処理〔アニール化処理した金メッキ体を、その周囲に形成される酸化被膜を除去するために、2M NaOH中で1hr煮沸した後、1.42濃硝酸で30min攪拌、超純水(mill-Q水)で充分洗浄〕してから行った。

2 pmol/ $\mu$ LのS-H基を有するプローブとしてのHS-P72〔p53遺伝子のコドン72 SNPS(P)、配列構造; HS-(5')AGG CTG CTC CCC CCG TGG CC〕水溶液1 $\mu$ Lを、表面処理した金メッキ体としての複数のピン上にディップ(dip)し、それぞれの金メッキ体の表面に多数の分子を固定化させた(オーバーナイト、室温)。各ピンへのプローブの固定化の際は、乾燥を防止するため、それら複数のピン全体がウェット(wet)パット内になるようにして行った。

#### (固定化量)

固定化量の算出の前に、予め固定化後の表面処理金メッキ体(ピン)について、Au-S結合で固定化された分子以外の残存したHS-P72非特異吸着種を除去した。その後、固定化した表面処理金メッキ体(ピン)を、下記組成の電解液に5分間浸漬させた。

電解液組成: 50  $\mu$ M FND (Ferrocenylnaphthalene diimide; フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体)

0.1M 酢酸バッファー (pH 5.6)

0.1M KCl

この際、静電的相互作用(カチオニックなFNDがアニオニックな固定化プロ

ープポリリン酸部に静電的に濃縮する作用)と疎水的相互作用(FNDのナフタレンジイミド部と固定化プローブの塩基との間の疎水性相互作用)により、FNDが固定化プローブに濃縮される。この濃縮FND量を、FND両末端に連結させた電気化学活性種フェロセンのDPV(ディファレンシャルパルスボルタモグラフィ)による酸化電流値により定量し、これをプローブ固定化量として算出した。即ち、表面処理金メッキ体としてのピンの表面への分子の固定化量(ピン1本当たり)を電流値( $\mu\text{A}$ )として求めた。その結果を下記結果欄に示す。尚、この電流値が大きいほど固定化量が多いことを示し、電流値が小さいほど固定化量が少ないことを示す。

#### 〔実施例2〕

温度700℃でアニール化処理した以外は、実施例1と同様にして、金メッキ体の表面処理物を得た。アニール化処理については、室温(25℃)の初期温度から昇温速度19℃/min.で昇温しながら行い、ピーク温度700℃となったときに昇温を止め、その後定温状態で行った。この際、600℃以上の処理を約40分間行なった。

得られた金メッキ体の表面処理物について、実施例1と同様にして、(1, 1, 1)面の含有率(%)及び固定化量( $\mu\text{A}$ )を算出した。その結果を下記結果欄に示す。

#### 〔実施例3〕

金メッキ溶液中にタリウム系結晶成長剤(硫酸タリウム; $\text{Tl}_2\text{SO}_4$ )を0.002g/l(2ppm)添加した以外は、実施例2と同様にして、金メッキ体の表面処理物を得た。

得られた金メッキ体の表面処理物について、実施例1と同様にして、(1, 1, 1)面の含有率(%)及び固定化量( $\mu\text{A}$ )を算出した。その結果を下記結果欄に示す。

#### 〔実施例4〕

実施例1における金メッキ体の作製の段階において、金メッキ溶液中にタリウム系結晶成長剤(硫酸タリウム; $\text{Tl}_2\text{SO}_4$ )を0.002g/l(2ppm)添加した以外は、実施例1と同様にして、金メッキ体を得た。

得られた金メッキ体（アニール化処理なし）について、実施例 1 の表面処理物と同様にして、（1， 1， 1）面の含有率（％）及び固定化量（ $\mu$  A）を算出した。その結果を下記結果欄に示す。

〔比較例 1〕

実施例 1 と同様にして金メッキ体を得た後、アニール化処理を行わず、その金メッキ体をそのまま使用した。これについて実施例 1 と同様にして、（1， 1， 1）面の含有率（％）及び固定化量（ $\mu$  A）を算出した。その結果を下記結果欄に示す。

〔結果欄〕

	(1,1,1)面の含有率（％）	固定化量（ $\mu$ A）
実施例 1		
（450℃アニール化）	6 8 . 0	1 . 4 3 3
実施例 2		
（700℃アニール化）	7 8 . 7	1 . 4 6 5
実施例 3		
（メッキ添加剤+700℃アニール化）	8 2 . 5	2 . 0 5 9
実施例 4		
（メッキ添加剤）	3 6 . 9	1 . 6 4 8
比較例 1		
（メッキ添加剤なし・アニール化なし）	1 3 . 3	0 . 7 9 8

以上の結果から明らかなように、金メッキ体の表面に特定範囲の温度でアニール化処理する本発明の表面処理法（実施例 1 ～ 3）及び特定のメッキ添加剤（結晶成長剤）を原料とする本発明の金メッキ体の製造方法（実施例 3、 4）によれば、メッキ添加剤（結晶成長剤）を使用せず且つアニール化処理しない比較例 1 の場合に比して、得られる金メッキ体表面処理物又は金メッキ体の表面金結晶構造における（1， 1， 1）面の含有率が高く、また含硫黄分子の金表面への固定化量も多いことが判る。

【発明の効果】

本発明によれば、多量の含硫黄分子の固定化を可能にする、金メッキ体の表面

処理方法及び表面処理物、金メッキ体の製造方法及び金メッキ体、並びに含硫黄分子の固定化法が提供される。

10067502, 1006702